



77

הופק בתאריך: 18.02.98

דו"ח דיווח מדעי

=====

קוד זיהוי: 204-0370-97

נושא המחקר: התמרה של גפן בגנים בעלי פעילות אנטי פטרייתית בנסיון
להקנות עמידות למחלות פטרייתיות

סוג דו"ח: מדעי שנת

חוקר ראשי: פרל אביחי

חוקרים משניים: גולופ רחל
ראובני משה



מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

קרן מדען ראשי
המועצה לפירות

תקציר הדו"ח:

מטרת המחקר היא יצירת צמחי גפן מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת לקמחון, כשנתית ובוטריטיס.

העמידות מקורה בכטוי גנים המקדדים לחלבונים בעלי פעילות אנטי-פונגלית. נבנו קונסטרוקטים שהכילו 2-3 גנים שונים מקבוצת האנדוכיטינאז, גלוקונאז, חלבונים מעכבי רבזומים (RIP), ו STS המקדד לפיטואלקסין RESVERATROL התחלנו בטרנספורמציה לתרבויות אמבריוגניות של גפן. בידנו צמחים טרנסגניים והזנים 41B, ו 902. המבטאים את הגנים STS, GLU, ו RIP. עמידותם תבחן בשנה הקרובה ברמת העלים במעבדה וברמת הכרם בשלב מאוחר יותר. אנו צופים לקבל צמחים עם עמידות משופרת למחלות פטרייתיות אשר ידרשו רסוסים מועטים יותר או יוכלו לגדול ללא רסוס כלל.

חתימות ואישורים:

19.2.98 סוכרמנו 97/10/10 מנהל המכון מנהל המחלקה חוקר ראשי

דוח שנתי לשנת 1997

התמרה של גפן בגנים בעלי פעילות אנטי-פטרייתית בנסיון להקנות עמידות למחלות פטריות.

אביחי פרל, גולופ רחל, משה ראובני.

המחלקה להשבחת מטעים, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן, 50250 ומכון לחקר הגולן, קצרין.

Transformation of grape with antifungal constructs.

Perl, A., Gollop R. and Reuveni M.

Department of Fruit Tree Breeding and Molecular Genetics, The Volcani Center, ARO, P.O.Box 6 Bet-Dagan, 50250 Israel.

email: vhlperl@volcani.agri.gov.il

מבוא:

מטרת המחקר היא יצירת זני גפן מאכל מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת למחלות ורקבונות הנגרמות ע"י פטריות. הצמחים המהונדסים יבטאו מספר גנים שהוכחו כבעלי פעילות אנטי-פטרייתית ולאחרונה שמוש בהם הקנה לצמחים טרנסגניים עמידים למגוון מחלות פטריות. מחלות פטריות בגפן מאכל ויין ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי מספר אחד בענף הגפן בעולם כולו. גם בארץ הם מהווים כיום את אחת מהבעיות החמורות ביותר אתם מתמודד ענף הגפן בשנים האחרונות. קמחון בשלב הראשון וקומפלקס הרקבונות התוקף אחריו מהווים את אחד מגורמי הפחת החריפים ביותר בהם נתקל הענף כיום. הבעיה חמורה עד כדי כך, שבאיזורי גפן שמבשילים מאוחר ואפילו באזורי לכיש, הפרי נרקב רובו ככולו על העץ ללא פתרון נראה לעין. מרבית חומרי הרסוס כנגד רקבונות האשכול נמצאו כבילתי יעילים להורדת רמת הנגיעות בשטח. הסולטנינה שמהווה מרכיב חשוב בסל הזנים של אמצע-סוף העונה, סובלת מכך במיוחד. לצערנו, מחקרים בהגנת הצומח שבוצעו במרוצת 15 השנה האחרונות, לא תרמו לפתרון הבעיה ועם ירידת יעילות חומרי ההדברה, היא מתגברת מעונה לעונה. עם זאת, הצטברה האינפורמציה המוכיחה כי טפול יעיל להורדת רמת הנגיעות בקמחון בשלב המוקדם של העונה,

יקטין בצורה משמעותית גם את יכולת ההתבססות של גורמי הרקבון בפרי: הריזופוס, הבוטריטיס והעובשים למיניהם. עמידות לקמחון כשותית ובוטריטיס היא תכונה פוליגנית באופיה וניתן למצאה בגפני בר אמריקאיות. העברת העמידות מהן לזני *Vinifera* המסחריים כיום, בהשבה קונונציונלית, הוא פרויקט חסר סכוי שימשך עשרות שנים רבות ויעביר במקביל גם תכונות שליליות שיפגמו האיכות הזן.

מטרת המחקר:

מטרת העבודה היא לפתח צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות ע"י בטוי של אחד או יותר מהגנים המקדדים ל: β 1-3 Endocitinase, Glucanase ו Ribosome inactivating protein

פרוט המחקרים והתוצאות הראשוניות:

1. בוססה מערכת של התמינות עוברים מקאלוס של גפן ממגוון זני מאכל ויין מסחריים. נוצרו קוים אמבריוגניים מהזנים שרדונה, גמאי, 902, B4, סופריור סידלס, 49, איטליה, רד-גלוב, סולטנינה.
2. פותחו שיטות המאפשרות התמינות של עוברים אילו לצמחים, התקבלו צמחים בוגרים מושלמים הזהים לצמח המקור ביעילות גבוהה.
3. שופרה מערכת התמרה (טרנספורמציה) לגפן.
4. בודדו ושובטו גנים המקדדים לחלבונים בעלי פעילות אנטי פונגלית. Endochtinase שבודד מ *Trichoderma* β 1,3 Glucanase שגם הוא בודד מ *Trichoderma* RIP שבודד מזרעי שעורה נובטים. ה - β 1,3 Glucanase וה- Endochtinase שובטו לוקטור של אגרובקטריום בתוספת סיגנל להכוונת תוצר הגן (appoplat targeting) לחללים הבין תאיים. כמוכן שובטו ה - β Glucanase 1,3 וה- RIP גם כן לוקטור טרנספורמציה בתוספת סיגנל דומה.
5. בוצעו נסיונות טרנספורמציה של קונסטרוקטים אילו לתרביות אמבריוגניות של הזנים סופריור, רד-גלוב ואיטליה. התקבלו צמחים טרנסגניים שיבדקו בשנה הבאה.

מסקנות והשלכותיהן:

ענף הגפן כיום נמצא בפריצה קדימה. השנה נמכרו בשווקים כ 55,000 טון פרי ומהם יוצאו מעל 10,000 טון. בשנים האחרונות צמצומו המגבלות של ה FDA על שווק זנים שמקורם בהנדסה גנטית, וכיום אפשר למצוא בשווקים עגבניות, כותנה, תפוחי-אדמה ועוד גדולים שנמכרים לאחר התמרה גנטית. מענין לציין שמחירם גבוה מעל אותו זן בדיוק אך ללא התמרה. הצרכן מקבל כיום בברכה מוצרים מהונדסים גנטית כי ברור לו היתרון על צריכת מוצרים עתירי רסוסים כימיים בחומרים מסוכנים לו ולסביבה. חשיבות העמידות לקמחון ולמחלות פטריותיות בגפן כלל אינה ניתנת להערכה. במקומות בהם מקובל לרסס בפונגיצידיים שונים כגון גופרית ואחרים, חייבים לרסס אחת לשבוע וגם אז לא מושג

נקיון מניח את הדעת. רסוסים תכופים בפונגיצידיים הם פעולות הגוזלות זמן יקר, ימי עבודה רבים, עלותם גבוהה ויוצרים נזק בלתי הפיך לאדם ולסביבה. צמחים טרנסגניים שיפותחו בתוכנית זו יהיו בעלי עמידות משופרת כנגד פטריות - תכונה החסרה בצורה בולטת בכל הגפן האירופאית *Vitis vinifera* מגודלת בארץ. העמידות תהיה כלפי כל הפטריות, כולל קמחון וכשותית, המכילות בדופן תא הפטריה כיטין ו/או 1,3-βגלוקן. המוצר יאפשר הפחתת השימוש בחומרי הדברה מחד וקבלת יבולים ובצועים משופרים של הצמח מאידך. כל זן מהונדס גנטית ניתן לרשום והגנה בזכויות מטפחים כזן חדש ומפאת עמידותו היחודית ניתן למסחור בעולם כולו.

רשימת פרסומים:

1. Perl, A. and Eshdat, Y (1998) DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. In: Tombs (ed), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Intercept Publishers UK, Vol 15, pp. 365-386.
2. Perl, A., Coutos-Tevenot, P., Boulay, M. (1988) Proteases in plant cell culture and transformations. European Appl. (under registration).
3. Boulay, M.P., Perl, A., Mauro, M.C. and Coutos-Thevenot, P. (1997) les vignes transgeniques: Amelioration par voie moleculaire de la tolerance aux maladies des porte-greffes, des cepages et des varietes a raisin de table. Proceedings of the ANPP Meeting, The British Crop Protection Council, Couterbury, UK, September 17-19, 1997, pp 227-237.
4. Boulay, M.P., Perl, A., Mauro, M.C. and Coutos-Thevenot, P. (1997) Les vignes Transgeniques. Phyoma - La Defense des Vegetaux 499:18-23. (in French).

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. פתוח זני גפן חדשים עמידים למחלות פטריות, בעיקר קמחון כשותית ובוטריטיס.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. שפור יעילות טרנספורמציה בגפן, הגדלת מספר הקווים האמבריוניים במעבדה, בניית קונסטרוקטים המכילים מספר גנים בעלי פעילות אנטיפונגאלית, החדרה של חלק מהם לצמחי גפן בטרנספורמציה גנטית, התמינות צמחים וריבויים.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר. פרויקט בעל יכולת הצלחה בטווח הבינוני. ניתן להחדיר גנים לגפן כצמח מודל עיצי ביעילות סבירה.

4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן. המשך בניית קונסטרוקטים המכילים 2-3 גנים אנטיפונגאלים שונים על אותו וקטור. הרחבת מעגל הטרנספורמציות לזנים נוספים.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לצין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.

1. Perl, A. and Eshdat, Y (1998) DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. In: Tombs (ed), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Intercept Publishers UK, Vol 15, pp. 365-386.

2. Perl, A., Coutos-Tevenot, P., Boulay, M. (1988) Proteases in plant cell culture and transformations. European Appl. (under registration).

3. Boulay, M.P., Perl, A., Mauro, M.C. and Coutos-Thevenot, P. (1997) les vignes transgeniques: Amelioration par voie moleculaire de la tolerance aux maladies des porte-greffes, des cepages et des varietes a raisin de table. Proceedings of the ANPP Meeting, The British Crop Protection Council, Couterbury, UK, September 17-19, 1997, pp 227-237.

4. Boulay, M.P., Perl, A., Mauro, M.C. and Coutos-Thevenot, P. (1997) Les vignes Transgeniques. Phyoma - La Defense des Vegetaux 499:18-23. (in French).